

Model terapi gen menggunakan sel fibroblas rekombinan yang dibungkus mikro kapsul. Suatu Kajian *In Vivo*

M. Mansyur Romi

Bagian Anatomi, Embriologi & Antropologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

M. Mansyur Romi - *A model for gene therapy utilizing microencapsulated recombinant fibroblasts. An in vivo study*

Current approaches to human gene therapy focus on insertion of a desired gene into autologous cells such as fibroblasts, hepatocytes, bone marrow stem cells or lymphocytes. An alternate strategy to gene therapy through genetic modification of the patient's own cells is to implant into different recipients the same engineered cell line under immunologically isolated conditions. This *in vivo* study shows that human growth hormone (hGH) as a novel reporter gene product from microencapsulated genetically modified mouse cells is detectable in the circulation of allogenic recipient mice. On day 3 of post implantation no hGH was detected, 3 ng/ml of hGH was detected on day 12 and increased during the next 9 days up to 10-fold. The high level of hGH was maintained during days 21 - 33 post implantation and went down afterward to the baseline on day 45. No hGH was detected in the control mouse implanted with the same amount of free recombinant cells.

Key Words: Gene therapy - autologous cells - genetic modification - recombinant cells - lymphocytes

(B.I.Ked, Vol. 28, No. 3:115-120, September 1996)

PENGANTAR

Keberhasilan pembangunan bidang kesehatan di Indonesia dalam menanggulangi masalah kesehatan yang didominasi malnutrisi dan penyakit infeksi telah dirasakan oleh masyarakat. Selanjutnya pola penyakit akan mengalami pergeseran menjadi lebih diwarnai oleh penyakit degeneratif dan genetik. Pergeseran tersebut, yang juga dihadapi oleh negara-negara yang lebih maju, telah memacu perkembangan ilmu kedokteran dasar maupun teknologi kedokteran hingga peringkat molekular. Tambahan lagi, dengan makin memasyarakatnya konsep keluarga kecil maka perha-

tian terhadap adanya penyakit genetik makin meningkat pula.

Pada umumnya penyakit genetik dapat dimasukkan dalam tiga kelompok, yaitu (1) kelainan kromosom, (2) kelainan monogenik dan (3) kelainan multifaktorial¹. Akhir-akhir ini pengertian itu diperluas lagi dengan dua kelompok baru yaitu (4) kelainan DNA mitokondria dan (5) kelainan akibat mutasi sel somatik; kanker termasuk dalam kelompok terakhir ini².

Penelitian yang dikerjakan di Montreal, Baltimore dan Newcastle menunjukkan bahwa sekitar 6-8% kasus penyakit yang memerlukan perawatan rumah sakit berkaitan dengan kelainan-kelainan monogenik, antara 0,4-2,5% berhubungan dengan kelainan kromosom, sedangkan 22-31% di antaranya dipertimbangkan sebagai dipengaruhi oleh faktor genetik. Frekuensi kese-

M. Mansyur Romi, Department of Anatomy, Embryology and Anthropology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

luruhan penyakit monogenik adalah sekitar 1%³. Kajian lain mengemukakan sekitar 5,3% bayi lahir hidup diramalkan akan menderita penyakit yang komponen utamanya adalah persoalan genetik sebelum mereka mencapai usia 25 tahun. Jika kelainan multifaktorial yang serangannya lebih lambat ikut diperhitungkan, maka sekitar 60% kasus penyakit adalah karena pengaruh faktor genetik⁴.

Meskipun jenis-jenis baru penyakit genetik makin banyak ditemukan, pemahaman tentang penyebab penyakit tersebut berjalan lebih lambat. Sebagai gambaran, saat ini dikenal lebih dari 4.000 jenis penyakit monogenik, tetapi masih kurang dari 10% di antaranya yang diketahui secara jelas dasar cacat biokimiawinya⁵. Padahal pemahaman dasar penyebab tersebut sering tidak segera diikuti dengan pengertian tentang perkembangan penyakit selanjutnya. Misalnya saja mekanisme dan tahapan perkembangan sistem saraf pusat yang rusak pada penderita *phenylketonuria* (PKU) belum diketahui hingga kini, walaupun dasar biokimiawi penderita PKU telah dikenal sejak tahun 1930an⁶. Lubang-lubang tersebut di atas mengakibatkan ikhtiar terapi terhadap penyakit-penyakit genetik masih kurang memadai. Di samping itu, penilaian keberhasilan terapi penyakit genetik juga merupakan persoalan tersendiri.

Akhir-akhir ini konsep terapi gen yang menyoal langsung pada gen mutan sebagai penyebab penyakit genetik makin giat dikembangkan. Pendekatan yang ditempuh untuk terapi gen pada umumnya berusaha menanamkan gen ke dalam sel-sel autolog dari penderita sendiri. Berbagai percobaan telah dikerjakan untuk menanamkan gen baru ke dalam sel-sel fibroblas⁷, hepatosit^{8,9}, sumsum tulang¹⁰ dan endotel¹¹. Kecuali itu, akhir-akhir ini ada juga yang ditujukan ke dalam limfosit¹² untuk terapi gen terhadap kanker¹³. Namun berbagai hambatan masih sulit untuk diatasi, seperti rendahnya jumlah sel yang dapat direkayasa, kesulitan mengkultur sel-sel primer, dan prosedur pelaksanaan yang cukup invasif. Terlebih lagi kebanyakan pendekatan itu menggunakan virus sebagai vektor gen yang dipindahkan, sehingga kemungkinan adanya bahaya yang terkandung dalam virus itu sendiri harus diperhatikan. Dalam percobaan ini ditempuh pendekatan lain yang diharapkan dapat meng-

hindari ketergantungan pada ketersediaan sel target yang autolog rekombinan maupun penggunaan virus sebagai vektor, digunakan fibroblas Ltk⁻ mencit sebagai sel target.

BAHAN DAN CARA

Kultur sel

Sel yang digunakan adalah fibroblas Ltk⁻ (tuna *l-thymidin kinase*) mencit yang sudah mengalami transformasi menjadi galur sel imortal. Sel-sel fibroblas dikultur di dalam media alpha-MEM yang diperkaya dengan l-glutamin (2 mM), serum sapi baru lahir (10%), penisilin (100 µ/ml) dan streptomisin (100 µg/ml). Kultur tersebut di-eraskan pada suhu 37°C, dengan 5% CO₂ dan kelembaban 100%. Penggantian media dan penjarangan sel dikerjakan secara berkala.

Transfeksi sel

Selanjutnya fibroblas yang tumbuh baik di-transfeksi dengan DNA plasmid yang disebut pNMG2, menggunakan metode presipitasi kalsium fosfat seperti yang diuraikan sebelumnya dalam Chang *et al.*⁷. Struktur pNMG2 berupa DNA berukuran 9,6 kb yang mengandung gen hormon pertumbuhan manusia (HPM) dan gen resistensi terhadap neomisin (GAMBAR 1). Setelah transfeksi, klon yang lolos dari seleksi dengan antibiotika G418 dan menghasilkan HPM dalam kadar tinggi dipergunakan untuk penelitian ini.

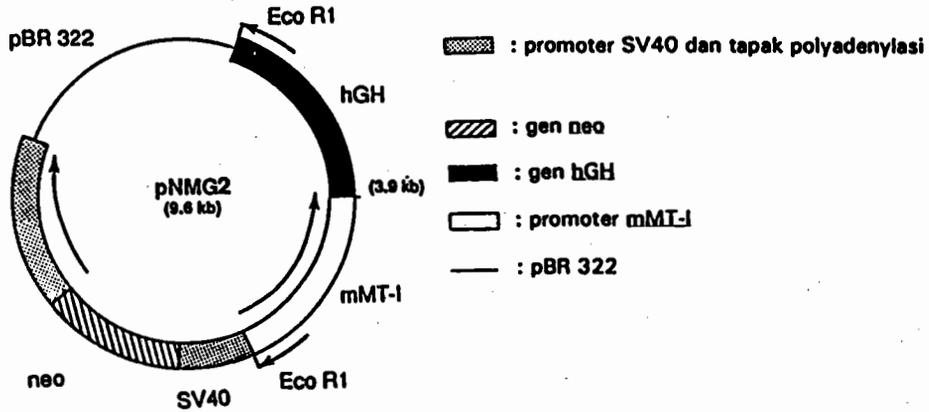
Pembungkusan sel rekombinan

Langkah berikutnya adalah pembungkusan klon fibroblas tersebut dengan mikrokapsul yang tersusun dari 3 lapisan, yaitu *alginate-polylysine-alginate*. Prosedur langkah ini mengikuti cara Sun *et al.*¹⁴. Secara garis besar, setelah sel-sel dipanen dengan tripsin kemudian dilarutkan dalam 15% natirum alginat (suatu ekstrak semak laut yang tersusun dari polisakarid *polymannuronic acid* dan *polyglucuronic acid*). Dengan suatu semprit (*air jet*) dihasilkan tetesan larutan sel yang berukuran 300-600 nm dan ditampung ke suatu bak Ca⁺⁺ sehingga terbentuk jendalan alginat. Lapisan permukaannya kemudian dianyam (*cross linked*) dengan polilisilin (BM 12.500 - 32.500) dan akhirnya dibungkus lagi dengan alginat sebagai lapisan terluar. Inti polisakarid yang tidak teranyam dibilas dengan *sodium citrate* sehingga

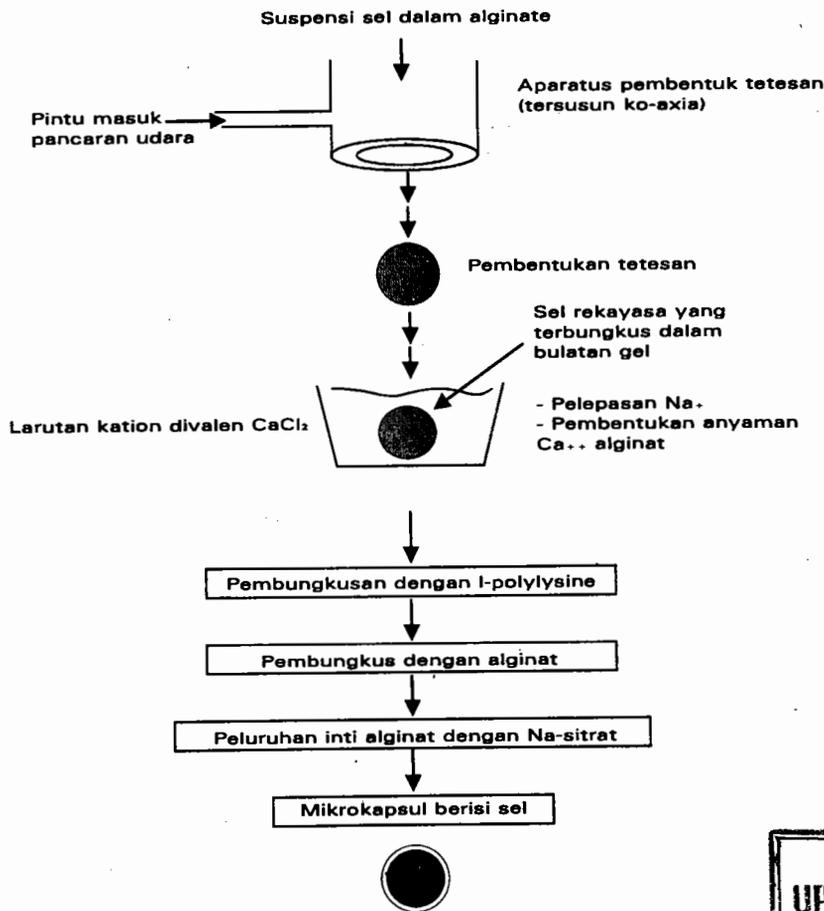
terbentuklah rongga untuk kelangsungan hidup sel-sel di dalam kapsul (GAMBAR 2). Sel-sel berkapsul dipelihara dalam kondisi kultur biasa dan diambil fotonya dengan mikroskop fase kontras.

Pengamatan *in vitro*

Terhadap fibroblas yang terbungkus mikro kapsul dikerjakan pengamatan untuk mengetahui 'kemampuan hidup' (*viability*), pertumbuhan dan sekresi HPM dari sel-sel tersebut. Cara pengamatan telah diuraikan dalam tulisan terdahulu¹⁵.



GAMBAR 1. - Struktur plasmid pNMG2



GAMBAR 2. - Bagan langkah-langkah pembuatan mikro kapsul berisi sel



Percobaan *in vivo*

Sebagai subjek dalam percobaan ini adalah mencit *allogenic*. Sekitar 10 juta sel yang terbungkus mikrokapsul berukuran masing-masing 300 μ diimplantasikan ke dalam rongga peritoneum tiap-tiap mencit. Perhitungan sel dikerjakan dengan memecah sejumlah kapsul menggunakan penumbuk (Baxter 749520-0000) sehingga sel terbebas di dalam tabung Eppendorf. Selanjutnya kepadatan sel dihitung menggunakan hemositometer (Improved Neubauer 0.1 mm) sehingga jumlah kapsul yang diperlukan untuk implantasi dapat ditentukan. Sebagai kontrol, sel fibroblas yang tidak terbungkus mikrokapsul dalam jumlah yang sama juga diimplantasikan ke dalam rongga peritoneum mencit.

Pada periode tertentu diambil contoh darah mencit melalui luka yang dibuat pada ekor untuk diperiksa kadar HPM yang beredar dalam sirkulasi darah menggunakan metode RIA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terapi konvensional terhadap penyakit genetik yang berakibat mengatasi gejala dan mencegah komplikasi yang dapat timbul, bagaimanapun, tetap penting perannya. Penelitian bersama yang dikerjakan Universitas McGill dan Johns Hopkins, secara sistematis menilai dampak terapi terhadap 351 kelainan-kelainan monogenik yang mewakili, dengan mengacu pada tiga variabel dasar, yaitu: jangka waktu hidup, kemampuan reproduksi dan adaptasi sosial penderita. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dengan upaya terapi yang tersedia maka 15% penderita dapat mencapai usia hidup yang lazim, kemampuan reproduksi pada 11% penderita berjalan normal, sedang adaptasi sosial yang wajar hanya ditemukan pada 6% penderita¹⁶.

Dengan pesatnya perkembangan genetika dan biologi molekular, khususnya teknologi DNA rekombinan dan transfer genetik, konsep terapi gen menjadi makin jelas sosok dan keberadaannya. Beberapa pemikiran teoretik tentang terapi gen telah dikemukakan, salah satunya adalah penggantian rangkaian gen mutan pada genom oleh suatu gen normal yang fungsional (*gene replacement*). Strategi lainnya dengan membetulkan rangkaian gen mutan tersebut tanpa menambatkan perubahan pada genom sasaran (*gene*

correction)¹⁷. Sejauh ini kedua strategi tersebut belum ada landasan operasionalnya. Yang dianggap lebih layak dibanding dengan kedua strategi tadi adalah merekayasa kandungan atau ekspresi gen mutan dalam sel-sel yang cacat dengan rangkaian gen normal baru dari luar sel atau menambahkan produk gen yang hilang¹⁸. Strategi ini efektif bila hasil gen tersebut berupa peptid atau protein yang beredar dalam aliran darah.

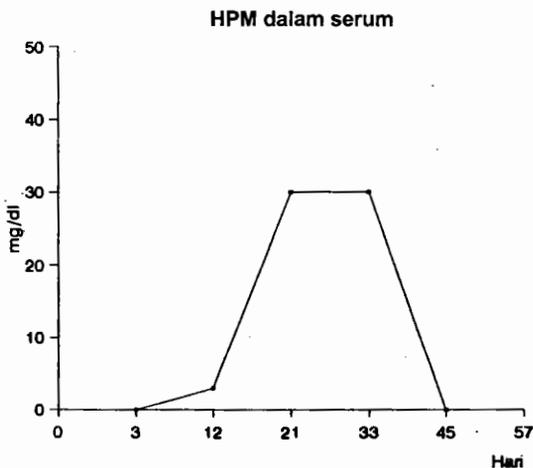
Model-model percobaan untuk terapi gen pada umumnya menggunakan virus sebagai vektor bagi gen yang dipindahkan, karena virus dianggap mampu mencapai semua sel target. Walaupun cara ini dianggap efisien, tetapi kemungkinan adanya bahaya yang dibawa oleh virus perlu diperhatikan. Karena itu percobaan ini memilih untuk menggunakan transfer gen secara kimia-fisik, dalam hal ini adalah presipitasi kalsium-fosfat. Cara yang dianggap kurang efisien ini kiranya cukup memadai untuk dipakai dalam strategi yang ditempuh, karena sel target tidak terbatas pada sel-sel autolog. Sel Ltk⁻ mencit telah dikenal sebagai sel yang mudah menjalani transfeksi termasuk dengan cara presipitasi kalsium-fosfat, di samping mudah pula dalam mengkulturkannya. Keberhasilan transfer gen juga dipengaruhi oleh DNA yang dipindahkan. Sebelumnya telah dikaji bahwa sebagai gen reporter, sistem yang melibatkan gen hormon pertumbuhan manusia adalah sangat sensitif dan relatif mudah dikerjakan¹⁹.

Prosedur pembungkusan dengan mikrokapsul memerlukan waktu yang cukup panjang, dapat melebihi 1 jam. Panjangnya waktu yang diperlukan berpengaruh terhadap kelangsungan hidup fibroblas, mengingat selama itu mereka bukan berada dalam lingkungan yang baik untuk kultur. Ternyata fibroblas dapat melewati prosedur pembungkusan dengan mikrokapsul dan mempertahankan 'kemampuan hidup' (*viabilitas*) di atas 90%, bahkan selama lebih dari tiga minggu angka itu tetap dapat dipertahankan tidak kurang dari 80%. Dalam percobaan *in vitro* terlihat pula bahwa fibroblas rekombinan Ltk⁻ mencit dapat tumbuh dan memproduksi HPM di dalam mikrokapsul serta menghantarkannya ke medium¹⁵. Hal ini perlu dikaji lebih lanjut, mengingat pada umumnya pertumbuhan fibroblas dapat terjadi bila mereka menapak pada suatu permukaan yang padat. Pertumbuhan dalam mikrokapsul rupanya

dipengaruhi oleh kepadatan sel yang diperoleh sesuai pengkapsulan. Didapati bahwa untuk mikrokapsul berukuran 300-400 μ , tampaknya fibroblas dapat tumbuh dengan baik pada kepadatan awal sekitar 70 sel/kapsul.

Dalam percobaan *in vivo*, pada hari ke-3 pasca implantasi sel rekombinan yang terbungkus mikrokapsul ternyata hampir tidak ada HPM yang terdeteksi dalam darah mencit sehingga dapat dianggap tetap pada garis dasar.

Meskipun pada pengamatan *in vitro* tampak bahwa sel rekombinan dapat terus memproduksi HPM, namun boleh jadi jumlah yang beredar dalam sirkulasi darah belum melewati ambang yang dapat dideteksi dengan pemeriksaan RIA. Baru setelah 9 hari berikutnya terdeteksi HPM sebanyak 3 μ g/ml serum darah mencit. Jumlah itu meningkat 10 kali lipat menjadi 30 μ g/ml pada hari ke-21 dan bertahan terus sampai hari ke-33. Selanjutnya HPM dalam darah mencit mengalami penurunan dan kembali ke garis dasar lagi pada hari ke-45 (GAMBAR 3).



GAMBAR 3. - Hormon pertumbuhan dalam serum mencit.

Sementara itu pada mencit kontrol yang diimplantasi dengan fibroblas rekombinan dalam jumlah yang sama tidak pernah terdeteksi adanya HPM dalam sirkulasi darahnya. Hal ini berarti bahwa sel rekombinan tidak dapat berfungsi sebagaimana mestinya dalam memproduksi HPM, salah satunya diperkirakan karena ada reaksi penolakan dari tubuh inang. Pada sel rekombinan yang dibungkus mikrokapsul reaksi penolakan itu dapat dicegah sehingga tetap mampu berproduksi, terbukti dengan adanya HPM dalam aliran darah. Mengenai turunnya HPM yang beredar setelah

hari ke-45 pasca implantasi perlu dikaji lebih lanjut. Dari pembedahan hewan coba tampak implan mikrokapsul terselubungi oleh fibroblas dan jaringan ikat dari penerima, sehingga paling tidak berpengaruh terhadap permeabilitas kapsul. Adapun terhadap sel rekombinan sendiri, ternyata dari implan tersebut dapat dikultur kembali dan tetap mampu memproduksi HPM. Jadi kelangsungan hidup sel rekombinan dapat dipertahankan walaupun telah diimplantasikan selama 45 hari.

KESIMPULAN

Percobaan ini mencoba mengajukan strategi alternatif yang menghindari ketergantungan pada ketersediaan sel target autolog dan virus sebagai vektor gen yang dipindahkan. Pendekatan yang ditempuh adalah dengan merekayasa sel non-autolog yang mudah dikultur dan ditransfeksi untuk menghasilkan produk gen yang dimaksud, kemudian membungkusnya dengan mikrokapsul semipermeabel guna mencegah singgungan dengan mediator kekebalan dari inang yang menerimanya.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa fibroblas Ltk⁻ mencit sebagai sel target yang non-autolog bila dilindungi dengan mikrokapsul tampak mampu untuk bertahan hidup, tumbuh dan mengantarkan produk gen rekombinan, yang berupa hormon pertumbuhan manusia, di dalam mencit allogenik sepanjang kurun waktu tertentu.

PERNYATAAN TERIMA KASIH

Rasa terima kasih tertuju kepada Prof. Dr. P.L.Chang, Dept. of Pediatrics, McMaster University, Hamilton, Canada dan Dr. A.M.Sun, Dept. of Physiology, University of Toronto, Toronto, Canada, atas kesempatan belajar dan bekerja dalam laboratorium mereka. Penulis juga berterima kasih atas pemberian sponsor dari PAU Bioteknologi UGM.

KEPUSTAKAAN

1. Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D, McKusick VA, Stanbury JB, et al. Introduction to human biochemical and molecular genetics. McGraw-Hill, 1990.
2. Weatherall DJ. The new genetics and clinical practice. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1991.
3. Galjaard, Genetic metabolic diseases: early diagnosis and prenatal analysis. Amsterdam: Elsevier, 1980.
4. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, & Lowry RB. Genetic disorders in children and young adults: A population study. Am J Hum Genet 1988; 42:677.

5. Ropers HH, & Wieringa B. The recombinant DNA revolution: implications for diagnosis and prevention of inherited disease. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol* 1989; 32: 15-27.
6. Mange AP, & Mange EJ. *Genetics: Human aspects*, 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
7. Chang PL, Gunby JL, Tomkins DJ, Mak I, Rosa NE, & Mak S. Transformation of human cultured fibroblasts with plasmids carrying dominant selection markers and immortalizing potential. *Exp Cell Res* 1986; 167: 407-16.
8. Ledley FD, Darlington DJ, Hahn T, & Woo SLC. Retroviral gene transfer into primary hepatocytes: implication for genetic therapy of liver-specific function. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1987; 84: 5335-9
9. Wilson JM, Jhonston DE, Jefferson DM, & Mulligan R.C. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4421-5.
10. Dzierzak EA, Papayannapoulou T, & Mulligan RC. Lineage-specific expression of a human beta globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus transduced stem cells. *Nature* 1988; 331: 35-41.
11. Wilson JM, Birinyi LK, Salomon RN, Libby P, Callow AD, & Mulligan R.C. Implantation of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. *Science* 1989; 244: 1344-6.
12. Culver K, Cornetta K, Morgan R, Morecki S, Aebersold P, Kasid, A, et al. 1991 Lymphocytes as cellular vehicle for gene therapy in mouse and man. *Proc Natl Acad Sci* 88:3155-9.
13. Rosenberg SA. Gene therapy of cancer In: V.T.DeVita, Jr., Hellman S, Rosenberg SA, editors *Important advances in oncology*. Philadelphia: Lippincott, 1992; 17-38.
14. Sun AM. Microencapsulation of pancreatic islet cells: A bioartificial endocrine pancreas. *Methods in Enzymol* 1988; 137: 575-9.
15. Romi MM, Sun AM, & Chang PL. Secretion of a novel gene product through microencapsulated recombinant cells. A preliminary report. *BIKed.* 1994; 16[3]: 117-24.
16. Hayes A, Costa T, Scriver CR, & Childs B. The effect of Mendelian disease on human health. II: Response to treatment. *Am J Med Genet* 1985; 21: 243.
17. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; 244: 1275-81.
18. Kingston Treatment of genetic disorders. *Br Med J* 1989; 298: 1499-501.
19. Selden RF, Howie KB, Rowe M.E, Goodman HM, & Moore D.D. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 3173-9.